

DIAGNOSING METHOD WITH NUCLEIC ACID

Patent Number: JP6113898
Publication date: 1994-04-26
Inventor(s): MURAMATSU TAKASHI; others: 03
Applicant(s): MITSUI TOATSU CHEM INC; others: 01
Requested Patent: ☐ JP6113898
Application Number: JP19920270493 19921008
Priority Number(s):
IPC Classification: C12Q1/68; A61B5/14; C12N15/10
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To diagnose cancer by a northern blotting using a MK gene as a probe or by multiplying measurement target DNAs with the MK gene as a primer and subsequently detecting a DNA originated from a cancer tissue in the specimen by utilizing nucleic acid.

CONSTITUTION: While a mouse MK gene coding a MK protein which is a new growth differentiation factor originated from mouse tetracarcinoma cells is used as a probe, a specimen is screened by a northern hybridization method to obtain a human MK gene.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06113898 A**

(43) Date of publication of application: **26 . 04 . 94**

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68
A61B 5/14
C12N 15/10

(21) Application number: **04270493**

(22) Date of filing: **08 . 10 . 92**

(71) Applicant: **MITSUI TOATSU CHEM
INC MURAMATSU TAKASHI**

(72) Inventor: **MURAMATSU TAKASHI
MURAMATSU TOSHIKO
TSUTSUI JUNICHIRO
AWAYA AKIRA**

(54) **DIAGNOSING METHOD WITH NUCLEIC ACID**

(57) Abstract:

PURPOSE: To diagnose cancer by a northern blotting using a MK gene as a probe or by multiplying measurement target DNAs with the MK gene as a primer and subsequently detecting a DNA originated from a cancer tissue in the specimen by utilizing nucleic acid.

CONSTITUTION: While a mouse MK gene coding a MK protein which is a new growth differentiation factor originated from mouse tetracalcinoma cells is used as a probe, a specimen is screened by a northern hybridization method to obtain a human MK gene.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-113898

(43)公開日 平成6年(1994)4月26日

| (51)Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | FI | 技術表示箇所 |
|--------------------------|------|---------|----------------|--------|
| C 1 2 Q 1/68 | A | 7823-4B | | |
| | Z | 7823-4B | | |
| A 6 1 B 5/14 | | 8932-4C | | |
| C 1 2 N 15/10 | | 8931-4B | C 1 2 N 15/ 00 | A |
| 審査請求 未請求 請求項の数2(全 3 頁) | | | | |

(21)出願番号 特願平4-270493

(22)出願日 平成4年(1992)10月8日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年8月25日
社団法人日本生化学会発行の「生化学Vol. 64, No. 8, 1992」に発表

(71)出願人 000003126

三井東圧化学株式会社
東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

(71)出願人 591038945

村松 喬
鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘3丁目26-9

(72)発明者 村松 喬

鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘3丁目26-9

(72)発明者 村松 寿子

鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘3丁目26-9

(72)発明者 筒井 順一郎

鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘8丁目27-1

(74)代理人 弁理士 若林 忠

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸診断法

(57)【要約】

【目的】 核酸を利用する生体試料に対する新規な診断方法の提供。

【構成】 MK遺伝子をプローブとしてノザンプロットを行う。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 MK遺伝子をプローブとしてノザンプロットを行うことを特徴とする癌の診断方法。

【請求項2】 MK遺伝子断片をプライマーとして、測定対象のDNAをPCRによって増幅して、測定対象中のMK遺伝子の存在の有無を検出することを特徴とする癌の診断方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は新規な、癌の診断薬に関するものであり、さらに詳しく言えば、MK遺伝子をプローブとしてノザンプロットを行うことを特徴とする癌の診断方法およびMK遺伝子の断片オリゴヌクレオチドをプライマーとして、測定対象のDNAをPCRによって増幅して、測定対象中のMK遺伝子の存在の有無を検出することを特徴とする癌の診断方法に関する。

【0002】

【背景技術】癌細胞に特異的に発現する抗原、酵素、あるいは発癌遺伝子産物タンパク質等の各種の癌関連抗原はこれまで幾多も発見され、それら多数の抗原をコードするそれぞれの遺伝子を用いて、癌の組織診断が行われまた試みられている。発癌遺伝子の例ではras遺伝子、myc遺伝子などが代表例である。体内各臓器の癌細胞、白血病細胞、さらに様々な増殖サイクル、増殖過程の癌細胞等に出現あるいは存在する癌関連抗原をコードする遺伝子は、研究努力により今後も数多く見出され、それら新たな腫瘍の遺伝子マーカーを複数組み合わせ用いて、癌の診断成績はより向上するものと考えられる。

【0003】本発明者らは、先にマウステラトカルシノーマ細胞由来の新たな成長分化因子を見出し、MKタンパク質、Midkineと命名し、またMidkine（以下MKと略記する）コードするMK遺伝子をクローニングし、これら知見を報告した（Tomomura, M. et al, J. Biol. Chem., 265, 10765-10770, 1990）。このMidkineは118アミノ酸残基よりなるタンパク質で、その後の研究により、MKは各種神経細胞の神経突起伸長、生存維持、成熟の誘導を作用を有することが明らかにされた（Muramatsu, H. and Muramatsu, T., Biochem. Biophys. Res. Commun., 177, 652-658, 1991）。

【0004】本発明者らはついでマウスMK遺伝子を用いてヒトMK遺伝子をクローニングし（Tsutsui, J., Biochem. Biophys. Res. Commun., 176, 792-797, 1991）、さらにこれら遺伝子を動物細胞あるいは、大腸菌において発現させ、MKを調製することに成功し、特許出願した（特願平3-195397）。さらに本発明者らは、このMKをマウスやウサギ等に免疫し抗体を作製し、さらにこのcrudeな抗体を、前記の大量にタンパク質発現したMKを用いてアフィニティー精製することによりpureな抗体を調製したが、この抗MK抗体を使用して、神経細胞などの他にいくつかの癌細胞につき組織化学染色を試み、さらに癌

細胞培養系に抗MK抗体を加えてみた。すると意外にも癌細胞の多くが該抗MK抗体により組織染色され、さらにWilms'腫瘍細胞などの癌細胞の培養系においては、癌細胞の増殖が相当程度、阻止されることを見出し、MKが癌関連抗原であることを明らかにするに至り、これら知見をもとに別の特許出願を行った。

【0005】

【発明の開示】本発明者らはさらに、上記の知見とは別に、MKをコードするMK遺伝子をプローブとして、化学合成機などを用い、あるいはPCR法などにより調製し、これを用いて、神経細胞および前記のWilms'腫瘍細胞ほか各種癌細胞につき、ノザンプロットを行ったところ、意外にも神経細胞以外にも癌細胞の多くがMK遺伝子を強く発現していること、さらに癌患者の癌病巣の生検組織細胞の多くがMK遺伝子を強く発現していること、一方正常細胞は全くか殆どMK遺伝子が発現していないことが明らかにされた。

【0006】本発明はかかる際だった知見をもとに鋭意研究を進め到達したものであるが、本発明の目的は、生体の組織細胞につき、MK遺伝子をプローブとしてノザンプロットを行うことにより癌（化）状態にあるか否かを診断する方法を提供することである。本発明の他の目的は、MK遺伝子をプライマーとして、測定対象のDNAをPCRによって増幅して、測定対象中のMK遺伝子の存在の有無を検出することによる癌の診断方法を提供することである。

【0007】本発明に用いるMK遺伝子プローブおよびPCR用プライマーは、常法により調製することができる。たとえばApplied Biosystems Inc. などを用いて製造する。

【0008】

【実施例】以下、参考例、実施例、実験例をもって本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

参考例 MK遺伝子プローブの調製

マウスMKcDNA（Tomomura, M. et al, J. Biol. Chem., 265, 10765-10770, 1990）のMspI断片（ヌクレオチド番号-38～444）を切り出して用いた。またヒトMKcDNA（Tsutsui, J. et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 176, 792-797, 1991）の全長を用いた。

【0009】

実施例1 細胞からのRNA分離とノザンプロット
患者、健常人および実験動物の各臓器・組織・細胞の全細胞RNAをグアニジウムイソチオシアネート・セシウムクロライド法（Chirgwin, J. M.ら、Biochemistry, 18, 5294-5299, 1979）によって分離した。各RNAにつき10μgずつ1%グリオキサールアガロースゲルにのせ、1.5ボルト/cmで16時間電気泳動を行った（Maniatis, T. et al, Molecular Cloning ; Cold Spring Harbor Laboratory, 1982）。ニトロセルロースフィルターにトランス

3

ファー後、 ^{32}P 標識MKプローブ（ランダムオリゴヌクレオチド標識）にてMK特異的RNAを検出した。ノザンハイブリダイゼーションの条件は42℃、50mM Tris HCl 緩衝液、pH8.0（1M NaCl、10mM EDTA、0.1%SDS、0.2%ポリビニルピロリドン、0.2%フィコール、0.2%ウシ血清アルブミン含有）中で15時間行った。

【0010】実施例2 PCR

マウスMKcDNA (Tomomura, M., J. Biol. Chem., 265, 10765-10770, 1990) の12-31塩基とアンチセンス鎖464-489を合成してプライマーとし、マウス各種癌組織・細胞

のmRNAからのcDNAをテンプレートとしてPCRを行った。変性は93℃1分、アニーリングは50℃2分、延長は72℃3分、25サイクル行った。PCR産物を1%アガロースゲル*

4

*泳動後、MK特異的プローブで、サザンハイブリダイゼーション（条件：ノザンハイブリダイゼーションに準じた）を行い、MKcDNAの存在、即ちMkmRNAの存在を検出・同定した。同様の手法でヒト癌組織・細胞に、ヒトMKcDNAの存在、即ちMKmRNAの存在を検出・同定した。

【0011】実験例

実施例1の実施により表1の結果を得た。MK遺伝子は肝癌、大腸癌、胃癌、肺癌、腎癌、Wilms' 腫瘍などによく発現しており、他方正常組織での発現は殆どないか弱いものであることがわかり、癌特異的なマーカーとして価値がある。

【0012】

【表1】

表1 ノザンプロット

| 組織・細胞 | +++ | ++ | + | - |
|-----------|-----|----|---|---|
| 正常肝 | | | | 1 |
| 肺癌 | 3 | | 1 | |
| 正常腎 | | | | 1 |
| 腎癌 | 2 | | 1 | 1 |
| Wilms' 腫瘍 | 4 | | | |
| 大腸癌 | 7 | | 2 | |
| 正常胃粘膜 | | | | 1 |
| 胃癌 | 1 | 4 | 2 | |
| 正常肺粘膜 | | | 1 | |
| 肺癌 | 2 | | | |

【0013】

※対象のDNA をPCR によって増巾し、被験試料に存在する

【発明の効果】MK遺伝子断片をプライマーとして、測定※30 癌組織由来のDNA の検出・同定ができる。

フロントページの続き

(72)発明者 栗屋 昭

神奈川県横浜市戸塚区戸塚町4978の1の

206